

ノロウイルス検査における抽出コントロールとしての
エコーウイルス9型 Hill株の Real-time RT-PCR 法による検出

木田浩司, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志 (ウイルス科)

【調査研究】

ノロウイルス検査における抽出コントロールとしての エコーウイルス9型 Hill 株の Real-time RT-PCR 法による検出

Detection of Echovirus Type 9 strain Hill as Positive Control of RNA Extraction on Norovirus
Diagnosis by Real-Time Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction

木田浩司, 濱野雅子, 葛谷光隆, 藤井理津志 (ウイルス科)
Koji Kida, Masako Hamano, Mitsutaka Kuzuya, Ritsushi Fujii

要 旨

ノロウイルス (NoV) 検査における RNA 抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型 (E9) Hill 株を検出するための Real-time RT-PCR 法を開発した。従来, NoV の検出は Real-time RT-PCR 法で行われているが, E9 Hill 株の検出は RT-PCR 法で行われるために電気泳動や核酸染色等の煩雑な処理が必要であり, 最終判定までの律速段階となっていた。我々の開発した E9 Hill 株の Real-time RT-PCR 法は, NoV の検出と同時に実施できるため, 検査時間の大幅な短縮が可能になった。これは, 被害拡大予防の観点から迅速性が強く求められる食中毒事件の検査に非常に有用である。また, 本法は幅広い条件で安定して検出できるため, サポウイルス (SaV) やアストロウイルス (AstV) 等, 他のウイルスの Real-time RT-PCR 法による検査にも応用が可能であると考えられた。

[キーワード: ノロウイルス, エコーウイルス, サポウイルス, アストロウイルス, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe]

[Key words: Norovirus, Echovirus, Real-time RT-PCR, TaqMan MGB probe]

1 はじめに

感染性胃腸炎や冬期食中毒の主原因の1つであるノロウイルス (NoV) は, カリシウイルス科ノロウイルス属に分類され, 直径30-38nmで+鎖の一本鎖RNAを有しているが, 培養細胞・実験動物により人工的に増殖させる技術は, 未だ確立されていない¹⁾。そのため, 検出には逆転写酵素 (reverse transcriptase: RT) を利用した Real-time RT-PCR 法により実施される。しかし, 検査材料である糞便, 食品等は酵素反応を阻害する夾雑物を多量に含み, また一本鎖RNAはDNAと比較して不安定であるため, NoV 検査において, RNA抽出の成否確認は特に重要である。従来, NoV 検査におけるRNA抽出コントロールとして, エコーウイルス9型 (E9) Hill 株の RT-PCR 法^{2), 3)} が実施されてきた。しかし, この方法は電気泳動や核酸染色等の煩雑な処理が必要であるため長時間を要し, 最終判定までの律速段階となっていた。

そこで, NoV 検査の迅速化を目的に, E9 Hill 株を NoV と同時に Real-time RT-PCR 法で検出するためのプライ

マー及びプローブを新たに設計し, 実用性の検証を行った。また, NoV と同様に+鎖の一本鎖RNAを有し, 胃腸炎の原因となるサポウイルス⁴⁾ (SaV) 及びアストロウイルス⁵⁾ (AstV) の Real-time RT-PCR 法による検査への応用についても検証した。

2 材料と方法

2.1 ウイルスRNAの抽出

E9 Hill 株をヒト羊膜由来株化細胞の FL 細胞に接種して培養し, 上清中の力価を Reed-Münch 法で測定して調整を行い, 試験に供した。

厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知 NoV 検査法³⁾ に順じ, RNA抽出コントロールとして, PBS(-)138 μ L に, 検証試験ごとに異なる濃度に調整した E9 Hill 株を 2 μ L 加えて試験液とした。RNA抽出は市販のキット (QIAamp Viral RNA mini kit Qiagen 社製) を用い, 添付マニュアルに従って実施した。抽出RNAの DNase 処理は, DNaseI (5U/ μ L Takara 社製) を用いた。

RNA抽出液48 μL に、10x buffer 6 μL 、nuclease free water (Qiagen社製)3.6 μL 及びDNaseI 2.4 μL を加えて60 μL とし、37 $^{\circ}\text{C}$ 10分間消化した。次に100mM EDTAを1.5 μL 加え、65 $^{\circ}\text{C}$ 10分間処理し、DNaseIを失活させた。

2.2 逆転写反応によるcDNAの合成

逆転写反応は、RevaTra Ace(100U/ μL Toyobo社製)を用いた。DNase処理RNA抽出液5 μL に、Oligo(dT)₁₂₋₁₈Primer(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Invitrogen社製)1 μL 、pd(N)6 random hexamer(0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ Takara社製)1 μL 及びnuclease free water 2 μL を加え、70 $^{\circ}\text{C}$ で10分間加熱後ただちに氷中に移して急冷した。次に5x RT buffer 4 μL 、10mM dNTPs 2 μL 、Recombinant RNase Inhibitor(40U/ μL Takara社製)0.5 μL 、nuclease free water 3.5 μL 及びRevaTra Ace 1 μL を加えて20 μL とし、30 $^{\circ}\text{C}$ 10分間、42 $^{\circ}\text{C}$ 60分間及び98 $^{\circ}\text{C}$ 5分間反応させた。

2.3 E9 Hill株のReal-time RT-PCR用プライマー及びTaqMan MGBプローブの設計

E9 Hill株の全塩基配列7420base (accession No. X84981)から、従来のRT-PCR法^{2), 3)}で実績のある5192-5440領域を標的として、Primer Express 3.0ソフトウェア(life technologies社)を用いてプライマー及びTaqMan MGBプローブを設計した(表1)。

設計したプライマー及びTaqMan MGBプローブは、DNA Data Bank of Japan (DDBJ)のBLAST検索によって、動植物、細菌及び他属ウイルスに、現在まで非特異反応の原因となる配列が報告されていないことを確認した。

2.4 Real-time PCR法

逆転写終了後のReal-time PCR法には、TaqMan Gene Expression Master mix(life technologies社)を用いた。反応液18 μL にcDNA 2 μL を加えて20 μL (各プライマー0.4 μM 、TaqMan MGBプローブ0.2 μM)とした後、StepOnePlus(life technologies社)を用いて増幅反応を行った。反応条件は、50 $^{\circ}\text{C}$ 2分間、95 $^{\circ}\text{C}$ 10分間の後、熱変性95 $^{\circ}\text{C}$ 15秒間及び検証試験によって異なる伸長反応(52 $^{\circ}\text{C}$ ~62 $^{\circ}\text{C}$)を1分間行い、熱変性から伸長反応のサイクルを45回繰り返した。解析は、StepOne Software v2.1(life technologies社)を用いて行った。

2.5 伸長反応温度条件の検証試験

10⁴TCID₅₀/2 μL に調整したE9 Hill株を1検体あたり2 μL 添加し、RNA抽出後に作成したcDNAから、Real-time RT-PCR法における伸長反応温度条件の検証試験を行った。StepOnePlusのVeriflex機能を使用し、伸長反応温度条件を52 $^{\circ}\text{C}$ 、54 $^{\circ}\text{C}$ 、56 $^{\circ}\text{C}$ 、58 $^{\circ}\text{C}$ 、60 $^{\circ}\text{C}$ 及び62 $^{\circ}\text{C}$ に設定した。各温度設定ごとに、それぞれ2検体ずつ検証し、StepOne Software v2.1による解析結果から、伸長反応温度の最適条件及び使用可能温度範囲を決定した。

2.6 最適添加濃度の検証試験

10⁴TCID₅₀/2 μL に調整したE9 Hill株を10⁰TCID₅₀/2 μL まで10倍階段希釈し、1検体あたり2 μL 添加し、RNA抽出後に作成したcDNAからReal-time RT-PCRを行った。また、SaV⁴⁾及びAstV⁵⁾のReal-time RT-PCR法は、伸長反応温度が62 $^{\circ}\text{C}$ であるため、これらの検査への応用を考慮し、StepOnePlusのVeriflex機能を使用して伸長反応温度を56 $^{\circ}\text{C}$ (NoV検査)及び62 $^{\circ}\text{C}$ (SaV及びAstV検査)に設定した。各濃度及び伸長反応温度ご

表1 E9 Hill株のReal-time RT-PCRのプライマー及びプローブの塩基配列

プライマー またはプローブ名	塩基長 (base)	塩基配列	部位*
E9-real-F	20	5'-CGT CTC AGT GGC TGG AAT CA-3'	5263-5282
E9-real-R	21	5'-CCC TGT GTA TGC TCC TTG GAA-3'	5312-5332
E9MGB	22	5'-(FAM)-ACA TAA TCT ACA AAC TCT TTG C-(NFQ)-(MGB)-3'	5286-5307

* 開始部位はE9 Hill株の全塩基領域を対象とした5'末端 (accession number X84981)

とに2検体ずつ検証し、StepOne Software v2.1による解析結果から、E9 Hill株の最適添加濃度を決定した。

3 結果

3.1 伸長反応温度条件の検証試験

10^4 TCID₅₀/2 μ LのE9 Hill株を添加し、Real-time RT-PCR法の伸長反応温度を52℃、54℃、56℃、58℃、60℃及び62℃の条件でそれぞれ検証した。測定データはthreshold lineを0.05に設定して解析した。得られたthreshold cycle(Ct値)の平均値を、伸長反応温度ごとに比較した(図1)。その結果、伸長反応温度が58℃の時、Ct値が最も低く、22.6を示した。このことから、伸長反応温度は58℃が最も高感度であることが確認された。また、伸長反応温度が52℃の時、Ct値が最も高い24を示したが、その差は1.4サイクルであり、実用性に問題はないと考えられた。これらのことから、伸長反応温度は52℃～62℃まで幅広く使用可能であると結論づけた。

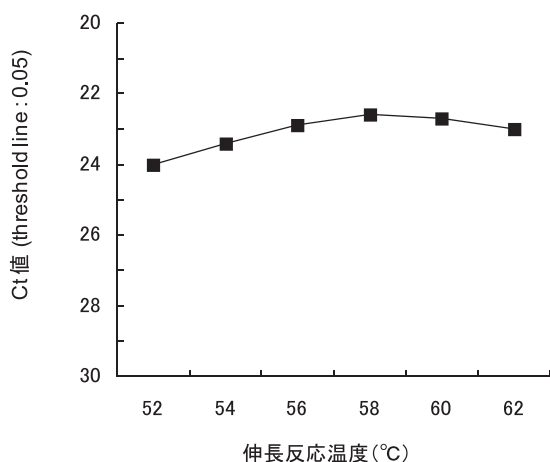


図1 伸長反応温度によるCt値の変化

3.2 最適添加濃度の検証試験

$10^4 \sim 10^0$ TCID₅₀/2 μ LのE9 Hill株をそれぞれ添加し、Real-time RT-PCR法の伸長反応温度を56℃及び62℃の条件でそれぞれ検証した。測定データはthreshold lineを0.05に設定して解析した。得られたCt値の平均値を、E9 Hill株の濃度及び伸長反応温度ごとに比較した(図2)。その結果、E9 Hill株の各濃度における56℃と62℃のCt値の差は0.1～0.3であった。また、E9 Hill株の希釈ごとのCt値の遅延は、伸長反応温度が56℃及び62℃ともに3.2～4.1の範囲であり、濃度による差は無かった。

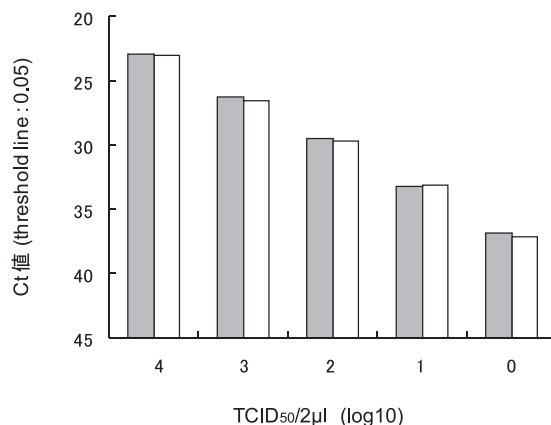


図2 E9の添加量によるCt値の変化

56℃:■ 62℃:□

4 考察

近年、NoV検査のウイルスRNA抽出コントロールとして、安全なE9 Hill株の利用が藤本らによって提唱され²⁾、厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知³⁾のNoV検査法に記載されたことから、広く使用されてきた。しかし、その検出はRT-PCR法で行うため、検査の律速段階となっていた。そこで、今回我々はE9 Hill株のReal-time RT-PCR法を開発し、NoV検査の迅速化を試みた。

最適添加濃度の検証試験の結果から、本法は幅広い濃度及び伸長反応温度で安定して使用できることが示唆された。実際のNoV検査においては、添加するE9 Hill株の濃度は低い方が好ましいと考えられるが、StepOnePlusの附属マニュアルにはCt値が35を超えると標準偏差が大きくなることが想定される旨の記載があるため、添加最適濃度はCt値が30付近となった 10^2 TCID₅₀/2 μ Lと結論づけた。従来法²⁾の最適濃度はRD18S細胞における $10^{3.5}$ TCID₅₀/25 μ Lとされており、両法は測定に使用した細胞が異なるために単純な比較はできないが、本法の方が低濃度であることが推測された。このことは、本法の利用によってNoV検査のReal-time RT-PCR法への非特異反応等の影響を軽減できることを示唆するものである。

Real-time RT-PCR法において、伸長反応温度の設定は重要であり、プライマーとプローブの設計によって最適化する必要がある。NoV検出³⁾のReal-time RT-PCR法における伸長反応温度は56℃であるが、SaV⁴⁾検査及びAstV⁵⁾検査は62℃である。本法の伸長反応温度が52℃～62℃まで幅広く使用可能であることが確認された

ことから、これらの検査だけでなく、多くのウイルス検査にも応用可能であることが示唆された。今後、NoVと同様に²⁾、ウイルス検査法ごとにE9 Hill株の添加による影響を検証することで応用範囲が広がると思われる。

また、一般にReal-time RT-PCR法の利点として、定量性が知られている。本法では、既知のコピー数の鋳型DNAを用いた検証を行っていない。しかし、鋳型DNA量が低濃度であっても安定して検出できることが確認されたことから、糞便材料からのウイルスRNA抽出効率の相対的な指標として使用可能であると考えられた。近年、Real-time RT-PCR法によって糞便中NoVの定量が可能になったが、糞便中には様々な酵素活性阻害物質が存在するにもかかわらず、ウイルスRNA抽出効率が不明であったため、正確な測定が不可能であった。しかし、本法を利用してウイルスRNA抽出率を補正することで、より正確な測定が可能になると考えられた。一方、本法は、プライマーとプローブの塩基配列から、エコーウイルスの多くに交差反応を示すと推測されることから、NoVとの混合感染をおこしている患者便では正確な定量が不可能になることを念頭に置く必要がある。

Real-time RT-PCR法は、迅速性や定量性など、多くの利点を併せ持つ検査法であり、今後様々な分野で応用されると考えられる。今回我々の開発したE9 Hill株のReal-time RT-PCR法によって、NoV検査の大幅な迅速化が可能となった。これは、被害拡大予防の観点から迅

速性が強く求められる食中毒事件の検査に非常に有用である。また、今後さらなる検証を重ねることで、より多くの検査への応用が期待できると考えられた。

文 献

- 1) 西尾治, 秋山美穂, 愛木智香子, 杉枝正明, 福田伸治, 西田知子, 植木洋, 入谷展弘, 篠原美千代, 木村博一: ノロウイルスによる食中毒について, 食品衛生学雑誌, 46(6), 235-245, 2005
- 2) 藤本嗣人, 近平雅嗣, 秋山美保, 西尾治: ノロウイルス検査におけるRNA抽出コントロールとしてのエコーウイルス9型Hill株の適用について, 兵庫県立健康環境科学研究センター年報, 2, 107-110, 2003
- 3) 厚生労働省医薬食品局食品安全部監視安全課長通知: ノロウイルスの検出法について, 食安監発第1105001号, 平成15年11月5日
- 4) Oka T., Katayama K., Hansman G.S., Kageyama T., Ogawa S., Wu F.T., White P.A., Takeda N.: Detection of human sapovirus by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction, J. Med. Virol. 78, 1347-1353, 2006
- 5) 横井一, 北橋智子: Real-time RT-PCR法によるアストロウイルス遺伝子の検出, 感染症雑誌, 83(2), 120-126, 2009